昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2005, 48(2):290－294　　ISSN 0454-6296

铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用

薛超彬^1,王　勤^2,柯莉娜^2,陈清西^2,罗万春^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院,农药毒理与应用技术省级重点实验室,山东泰安　271018;
2. 厦门大学生命科学学院,教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室,福建厦门　361005)

摘要:以菜青虫 *Pieris rapae* (L.)为试材,冰浴匀浆,4℃下 6 403 × g 离心,取上清液,经 35%饱和度$(NH_4)_2SO_4$ 沉淀,Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析等分离步骤,获得部分纯化的菜青虫多酚氧化酶制剂。研究不同浓度铜离子及铜铁试剂对该酶的影响,结果表明:Cu^{2+} 在 0～0.100 mmol/L 范围内对酶活力表现激活作用;浓度大于 0.125 mmol/L 时表现抑制作用,其 IC_{50} 为 0.651 ± 0.022 mmol/L;铜铁试剂对该酶抑制作用的 IC_{50} 为 0.100 ± 0.012 mmol/L。抑制动力学研究结果表明:铜铁试剂对该酶表现为可逆抑制效应,为竞争性抑制类型,其抑制常数 K_i 为 0.076 ± 0.013 mmol/L。

关键词:菜青虫;多酚氧化酶;铜离子;铜铁试剂;抑制作用

中图分类号:Q965.9　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2005)02-0290-05

Inhibitory effect of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae)

XUE Chao-Bin^1, WANG Qin^2, KE Li-Na^2, CHEN Qing-Xi^2, LUO Wan-Chun^{1*} (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: The kinetic properties of polyphenoloxidase (PPO) from *Pieris rapae* (L.) were studied after the enzyme was partially purified by 35% saturated $(NH_4)_2SO_4$ and chromatographed on a Sephadex G-100 gel filtration. Meanwhile, the effects of PPO on the oxidation of L-DOPA by adding copper ion or cupferron were also studied. The results showed that the activity of PPO was enhanced by Cu^{2+} in the concentration of 0－0.100 mmol/L; however, the activity was inhibited by the same ion when the concentration was over 0.125 mmol/L, and the IC_{50} was estimated to be 0.651 ± 0.022 mmol/L. The results also indicated that the reaction of cupferron with the PPO is a reversible course with remaining enzyme activity, the inhibitory mechanism belongs to be the competitive type and the IC_{50} was estimated to be 0.100 ± 0.012 mmol/L. Furthermore, the equilibrium constant for cupferron was determined to be 0.076 ± 0.013 mmol/L.

Key words: *Pieris rapae*; polyphenoloxidase; copper ion; cupferron; inhibition

多酚氧化酶(polyphenoloxidase,EC 1.14.18.1,简称 PPO)广泛存在于各种生物体内,也是昆虫体内的一种重要酶类,在昆虫的变态发育和免疫系统中起重要作用(Ashida and Yamazaki,1990;Boman *et al*.,1991)。多酚氧化酶具有单酚酶活性和二酚酶活性,能将酪氨酸羟化,产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴),然后再将多巴氧化成多巴醌,在非酶促条件下最终生成黑色素,使昆虫初生的、柔软的、色淡的新表皮得以黑化和硬化(Ashida and Yamazaki, 1990),这一过程对昆虫生命活动至关重要。

金属离子在酶的催化反应中起重要作用,估计有三分之一的酶在催化过程的一个或几个阶段中需要金属离子,金属离子通过使底物直接结合到活性部位或者通过可逆地改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应;或者通过静电稳定或屏蔽负电荷等途径参与酶的催化反应(王镜岩等,2003)。酚氧化酶是一种含铜的金属酶,每一个亚基均含有两个金属铜离子,两个铜离子分别与蛋白质分子中组氨酸结

基金项目:国家自然科学基金项目(30270887);博士后(王勤)科学基金资助项目

作者简介:薛超彬,男,1978 年生,山东东平人,农药毒理与天然源农药博士研究生,E-mail:cbxue12@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.(Fax):(0538)8242983;E-mail:wcluo@sdau.edu.cn

收稿日期 Received:2004-01-21;接受日期 Accepted:2004-06-24

合，另有一个内源桥基将两个铜离子联系在一起，构成酚氧化酶催化氧化反应的活性中心（Wilcox *et al.*，1985）。本文作者在对菜青虫 *Pieris rapae*（L.）不同虫态及虫龄多酚氧化酶酶学性质比较研究的基础上（薛超彬等，2004），以铜离子及金属螯合剂铜铁试剂为效应物，研究效应物对多酚氧化酶催化氧化反应的影响，旨在为以该酶为靶标的新型害虫控制剂研究进行一些理论探讨。

1　材料与方法

1.1　材料

菜青虫采自福建省厦门市集美区后溪镇菜园，在室内大量饲养。取5龄幼虫于 −20℃下保存，作为实验材料。L-多巴（L-DOPA）为 Sigma 化学公司产品；铜铁试剂（N-亚硝基-β-苯胲铵，一种重要的铜铁螯合剂）为上海远航试剂厂产品；$CuSO_4$ 为上海试剂一厂产品，分析纯；实验所用其他试剂也均为分析纯。

1.2　多酚氧化酶酶液的制备

采用薛超彬等（2004）的方法制得粗酶液，经35%饱和度$(NH_4)_2SO_4$ 沉淀，4℃ 6 403 ×g 离心30 min，取沉淀加入适量0.20 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.80）溶解，置于4℃ 0.01 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.80）中透析直至无 SO_4^{2-} 检出，期间更换数次透析液。将透析后酶液经 Sephadex G-100 凝胶过滤分离纯化，测定各分离管的酶活力，收集活力峰部分作为酶活力分析材料。

1.3　酶活力测定方法

方法同薛超彬等（2004）。

1.4　蛋白浓度测定

采用 Lowry Folin-酚法。

1.5　铜离子和铜铁试剂对酶活力影响的测定方法

按1.3节方法测定酶活力，测活体系中包含终浓度为1.0 mmol/L L-多巴，不同浓度系列的硫酸铜或铜铁试剂，加入200 μL 酶液，监测475 nm 下［消光系数 $\varepsilon = 3\ 700$ L/（mol·cm）］（Jiménez *et al.*，2001）光密度值随时间的增长直线，从直线斜率求得酶活力。酶活力单位（U）定义为在该条件下，每分钟产生1 mmol/L 产物的酶量。

2　结果与分析

2.1　酶的初步纯化

从菜青虫5龄幼虫提取的多酚氧化酶粗酶液经35%$(NH_4)_2SO_4$ 沉淀，酶活力提高3.08倍，得率为69.52%。再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析，酶活力提高至6.22倍，得率为42.50%（表1）。据 Jiang 和 Fu（1998）报道，采用同样的柱层析方法可以将梨中的多酚氧化酶纯化到11.6倍。表明用 Sephadex G-100 凝胶柱层析对菜青虫多酚氧化酶纯化有一定效果，但不甚理想。

表1　菜青虫多酚氧化酶的部分纯化

Table 1　Partial purification of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

纯化步骤 Purification step	总体积（mL） Total volume	总蛋白（mg） Total protein	总活力（U） Total activity	比活力（$\times 10^{-3}$）（U/mg） Specific activity	纯化倍数 Purification factor	得率（%） Yield
缓冲液提取液 Crude extract	52.5	588.00	50.40	85.71	1.00	100.00
35%硫酸铵沉淀 35% $(NH_4)_2SO_4$	24.0	132.72	35.04	264.01	3.08	69.52
Sephadex G-100	60.0	40.20	21.42	532.84	6.22	42.50

2.2　铜离子对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

以 $CuSO_4$、Na_2SO_4 和 K_2SO_4 为效应物，研究 Cu^{2+} 和 SO_4^{2-} 对菜青虫多酚氧化酶活力的影响。在0.20 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.80）中，以1.0 mmol/L L-多巴为底物，37℃条件下测定酶的相对活力，结果（表2）表明 SO_4^{2-} 对菜青虫多酚氧化酶活力无影响，因此可以明确在 $CuSO_4$ 中对酶起作用的是 Cu^{2+}（图1）。

酶的剩余活力与 Cu^{2+} 浓度的依赖关系见图1。当 Cu^{2+} 浓度在0～0.100 mmol/L 时，对多酚氧化酶活力表现为激活作用，尤其 Cu^{2+} 浓度在0～0.050 mmol/L 时，随 Cu^{2+} 浓度增大，酶活力逐渐增大；当 Cu^{2+} 浓度大于0.125 mmol/L 时，对酶活力逐渐表现为抑制作用，即随 Cu^{2+} 浓度增大其酶活力逐渐降低。经测定导致酶活力下降一半所需的 Cu^{2+} 浓度（IC_{50}）为 0.651±0.022 mmol/L。图2为跟踪 Cu^{2+} 对

酶活力影响的反应历程，在酶和底物反应 1 min 后加入不同浓度的 Cu^{2+}，当 Cu^{2+} 浓度为 0.030 mmol/L（曲线 2）时表现激活作用，当 Cu^{2+} 浓度为 0.250 mmol/L（曲线 3）时表现抑制作用。

表 2 SO_4^{2-} 对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

Table 2 Effect of SO_4^{2-} on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

效应物 Effector	**浓度**(mmol/L) Concentration	**相对活力**(mean ± *SE*)(%) Relative activity
对照 CK	–	100.000 ± 1.430
Na_2SO_4	2.50	99.593 ± 0.951
	5.00	99.823 ± 0.507
	10.00	100.532 ± 1.076
K_2SO_4	2.50	99.512 ± 1.074
	5.00	99.790 ± 0.662
	10.00	99.951 ± 0.913

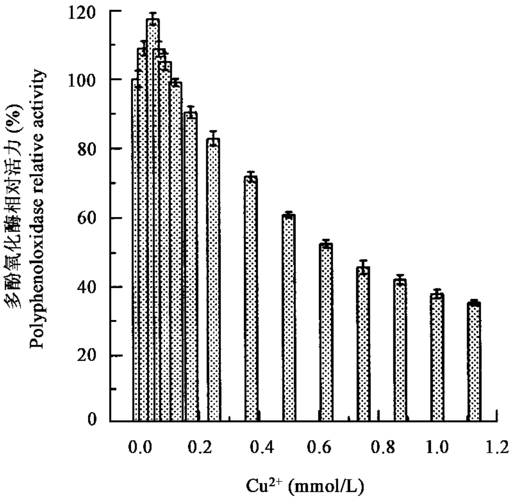

图 1 Cu^{2+} 对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of Cu^{2+} on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

2.3 铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

以铜铁试剂为抑制剂，探讨其对菜青虫多酚氧化酶催化 L-多巴氧化反应活力的影响。酶的剩余活力与抑制剂的浓度依赖关系见图 3，结果表明：在 0.20 mol/L 磷酸缓冲液，1.0 mmol/L L-多巴，37℃条件下，随着铜铁试剂浓度的增大，酶活力逐渐下降。由此系列数据计算得出，铜铁试剂对该酶活力下降一半所需的浓度（IC_{50}）为 0.100 ± 0.012 mmol/L。

2.4 铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用表现为可逆效应

在测活体系中，固定底物（L-多巴）浓度为 1.0 mmol/L，加入不同浓度铜铁试剂，改变酶的加入量，测定不同浓度铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶催化 L-多巴氧化活力的影响。图4表示酶经铜铁试剂作用后的剩余酶活力与加入酶量间的关系，酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线，表现为随着抑制剂浓度的增大，直线的斜率降低。此结果说明铜铁试剂对酶活力的抑制作用属于可逆过程，增加抑制剂浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制，催化效率降低，而不是通过导致有效的酶量减少，而引起酶活力的下降。

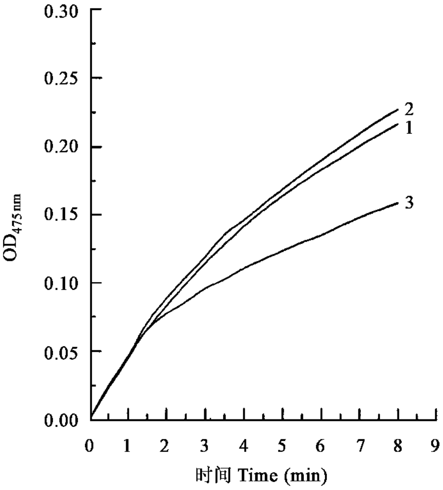

图 2 Cu^{2+} 浓度对菜青虫多酚氧化酶活力的影响

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

曲线 1 为酶与底物（L-DOPA）的反应历程；曲线 2 和曲线 3 分别为在酶与底物反应 1 min 后加入 Cu^{2+} 0.030 mmol/L 和 0.250 mmol/L 的反应历程

Curve 1 was the course of substrate reaction in the absence of Cu^{2+}; curve 2 and curve 3 were the course of substrate reaction in the presence of 0.030 mmol/L and 0.250 mmol/L Cu^{2+} after 1 min, respectively.

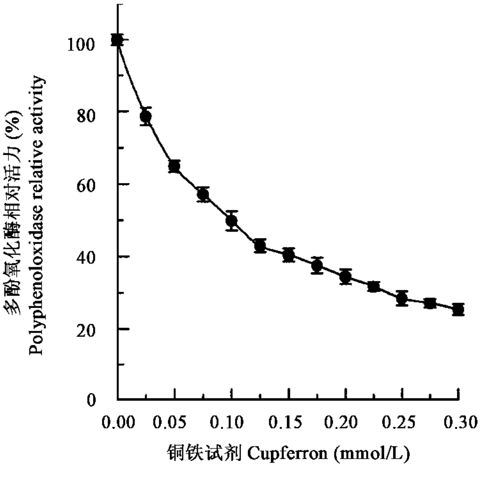

图 3 铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶活力的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

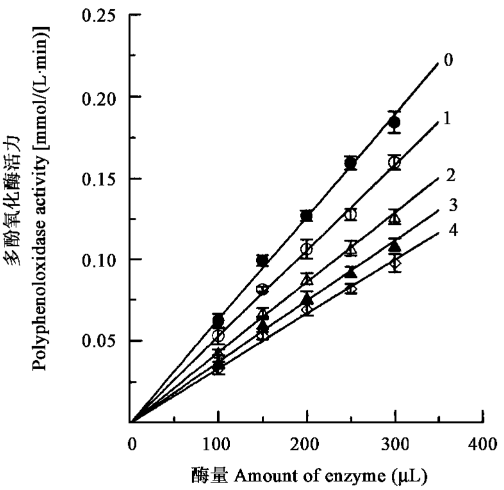

图 4　不同浓度铜铁试剂下酶活力与酶量的关系

Fig. 4　Effect of concentrations of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

曲线 0 ~ 4 **分别表示铜铁试剂浓度为** 0，0.025，0.050，0.075 **和** 0.100 mmol/L

Concentration of cupferron for curves 0 – 4 was 0，0.025，0.050，0.075 and 0.100 mmol/L，respectively.

2.5　铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶抑制类型及抑制常数的测定

在测活体系中，固定酶液的浓度，改变底物 L-多巴浓度，测定不同浓度铜铁试剂对酶活力的影响，以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线，此结果说明酶促反应遵循米氏（Michaelis-Menten）动力学方程。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图，可以判断抑制剂的抑制类型。图 5 为铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图，得到一组纵轴截距不变的直线，说明供试抑制剂不改变酶促反应的最大反应速度（V_{max}），只影响米氏常数（K_m），K_m 值随着铜铁试剂浓度的增大而增大，其抑制机理表现为竞争性类型，即表明在该实验中，底物和铜铁试剂与酶分子的结合是互相竞争的，铜铁试剂只能与游离酶（E）结合，而不能与酶-底物络合物（ES）结合。以不同浓度铜铁试剂条件下测定的 K_m 值对铜铁试剂浓度作图（图 5 内插图）为一条直线，从直线的斜率可以求得抑制常数（K_i）为 0.076 ± 0.013 mmol/L。

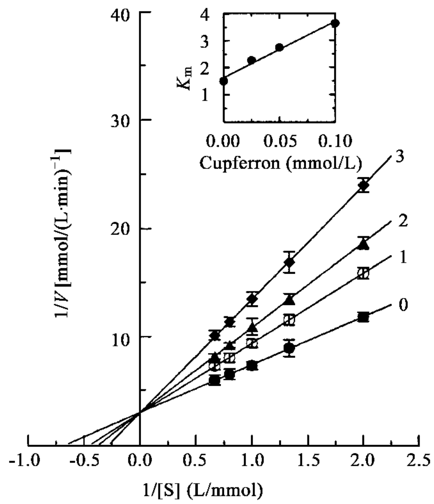

图 5　铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用（Lineweaver-Burk 双倒数作图）

Fig. 5　Lineweaver-Burk plots for inhibition of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*

曲线 0 ~ 3 **分别表示铜铁试剂浓度为** 0，0.025，0.050 **和** 0.100 mmol/L

Concentration of cupferron for curves 0 – 3 was 0，0.025，0.050 and 0.100 mmol/L，respectively.

3　讨论

昆虫的多酚氧化酶一般以无活性的酚氧化酶原的形式存在于血液和体壁内。这种酶原的活化方式大致有以下几种：(1) 酶自身的催化作用；(2) 酶亚单位的聚集；(3) 由某种活性物质分解部分酶原蛋白而使其活化。活性物质包括：(1) 唾腺的分泌物；(2) 体壁中的脂质；(3) 表皮中的一种蛋白质。酚氧化酶原的活化也可由激活剂以外的因素促成。在对酚氧化酶研究中，许多研究者使用十二烷基硫酸钠（SDS）（Juan *et al*.，1999）、十六烷基吡啶氯化物（CPC）作为酶原的激活剂（Michael *et al*.，2000）。在本研究中，我们制备的菜青虫多酚氧化酶具有催化活性，这可能是酶原已被上述一种或多种活化方式激活。在实验中，当加入较低浓度的 Cu^{2+} 时，可使酶活力提高 19% 左右，表现一定的激活作用，这或许是外加的 Cu^{2+} 与多酚氧化酶活性中心的铜离子具有相同的作用，使活力增大，表明铜离子在酶活性中心是必需的；当 Cu^{2+} 浓度超过 0.125 mmol/L 时，对该酶表现为抑制作用，且抑制程度随着外加铜离子浓度的增大而呈指数下降。此实验结果与 Cu^{2+} 对马铃薯酪氨酸酶（王君玲等，1995）的影响结果是一致的。其原因可能是过量的铜离子参与酶活性中心外的其他基团的相互作用，导致酶活力下降。

本研究发现铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶有明显的抑制作用，由于铜铁试剂是 Cu^{2+} 有效的螯合剂，其抑制机理很可能是铜铁试剂螯合了多酚氧化酶活性中心的 Cu^{2+}，使酶的活性中心的结构发生变化，以致于使酶活性降低。本实验测得其抑制类型

为竞争性抑制,即在反应过程中铜铁试剂和底物(L-多巴)同时竞争酶的活性部位,这与铜铁试剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理是一致的(Xie *et al*.,2003)。

国外从 20 世纪 60 年代开始,就有人开始对多酚氧化酶抑制剂进行研究。这类抑制剂在美白护肤、果蔬保鲜及食品防腐领域得到了迅速发展和应用(Kubo *et al*.,1999)。由于多酚氧化酶在昆虫生命活动中的重要作用,故该酶抑制剂理论在‘昆虫生命活动干扰剂’理论研究中有其重要意义。

参考文献(References)

Ashida M,Yamazaki H,1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insect:with special reference to its activation. In:Ohnishi E,Ishizaki H eds. Molting and Metamorphosis. Tokyo:Japan Science Society Press. 239 – 261.

Boman HG,Faye I,Gudmundsso GH,Lee JY,Lidholm DA,1991. Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins. *Eur*. *J*. *Biochem*.,201:23 – 31.

Jiang Y,Fu J,1998. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Food Chem*.,62(1):49 – 52.

Jiménez M,Chazarra S,Escribano J,Cabanes J,Garcia CF,2001. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J*. *Agric*. *Food Chem*.,49:4 063 – 4 064.

Juan CE,Jeroen VL,Harry JW,1999. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom(*Agaricus bisporus*)tyrosinase by serine proteases. *J*. *Agric*. *Food Chem*.,47:3 509 – 3 517.

Kubo I,Ikuyo KH,1999. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds. *J*. *Agric*. *Food Chem*.,47:4 574 – 4 578.

Michael RC,Kiran R,James B,Manickam S,2000. Purification characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem*. *Molec*. *Biol*.,30:953 – 967.

Wang JL,Kou RQ,Cheng H,Yuan JM,Zhou YA,1995. Partial purification of tyrosinase and some physical-chemical properties. *J*. *Shanxi University*(*Nat*. *Sci*. *Ed*.),18(2):184 – 189.[王君玲,口如琴,成汇,袁静明,周永安,1995. 马铃薯酪氨酸酶的部分纯化及理化性质的研究. 山西大学学报(自然科学版),18(2):184 – 189]

Wang JY,Zhu SG,Xu CF,2003. Biochemistry(3rd edition). Beijing:Higher Education Press. 465 – 467.[王镜岩,朱圣庚,徐长法,2003. 生物化学(第三版). 北京:高等教育出版社. 465 – 467]

Wilcox DE,Porras AG,Hwang YT,Lerch K,Winkler ME,Solomon EI,1985. Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J*. *Am*. *Chem*. *Soc*.,107:4 015 – 4 027.

Xie LP,Chen QX,Huang H,Liu XD,Chen HT,Zhang RQ,2003. Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Int*. *J*. *Biochem*. *Cell Biol*.,35(12):1 658 – 1 666.

Xue CB,Chen QX,Wang Q,Ke LN,Luo WC,2004. Comparison on properties of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*(L.) in different stages and instars. *Acta Entomol*. *Sin*.,47(3):305 – 309.[薛超彬,陈清西,王勤,柯莉娜,罗万春,2004. 菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较. 昆虫学报,47(3):305 – 309]

(责任编辑:黄玲巧)